

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

#3

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 02 SEP 2003	
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 30 141.7

Anmeldetag: 04. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Labor Diagnostik GmbH Leipzig, Leipzig/DE;
Dr. Cathrin Schleussner, Neu-Isenburg/DE

(vormals: Labor Diagnostik GmbH Leipzig,
Leipzig/DE;
Dr. Cathrin Schleussner, Dreieich/DE)

Bezeichnung: Verfahren zur Anreicherung und zum Nachweis von
veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc})

IPC: G 01 N 33/50

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. Juli 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

BEST AVAILABLE COPY

Stech

Zusammenfassung



Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis von pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc}) von lebenden Organismen.

Verfahren zur Anreicherung und zum Nachweis von veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc})

10 Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis von pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc}) von lebenden Organismen.

15 Transmissible Spongiforme Encephalopathien (TSE) sind beim Menschen und bei verschiedenen Tierarten auftretende, infektiöse und stets tödlich verlaufende degenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Die dabei auftretenden histopathologischen Veränderungen im Gehirn gehen einher mit der Akkumulation von pathologisch verändertem Prion-Protein (PrP^{Sc}), einem Konformer des natürlich vorkommenden zellulären Prion-Proteins (PrP^{C}). Die im Krankheitsverlauf auftretende Prionen-Replikation erfolgt durch direkte Wechselwirkung zwischen PrP^{Sc} und PrP^{C} , wodurch dem normalen PrP^{C} die Konformation des pathologischen PrP^{Sc} aufgezwungen wird. PrP^{Sc} ist im Unterschied zu PrP^{C} durch einen erhöhten β -Faltblatt-Anteil sowie eine hohe Resistenz gegenüber Proteasen (z.B. Proteinase K) gekennzeichnet.

20 Diese Resistenz des PrP^{Sc} wird derzeit in der *in-vitro*-Diagnostik zum Nachweis der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) genutzt. Das Prinzip der derzeitigen Testsysteme besteht darin, dass Gewebeteile des Stammhirns (Obex-Region) homogenisiert und mit Proteinase K behandelt werden. Durch die Protease-Behandlung wird das normale PrP^{C} vollständig abgebaut, während PrP^{Sc} aus BSE-infizierten Tieren lediglich um einige Aminosäuren verkürzt wird, was eine Reduktion der relativen Molekülmasse von 33-35 kDa auf 27-30 kDa zur Folge hat. Im Anschluss daran wird das verbleibende PrP mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern im Western-Blot oder ELISA-Verfahren visualisiert.

30 Der entscheidende Nachteil dieses Testsystems ist die geringe Sensitivität. Da die PrP^{Sc} -Konzentration bei BSE-infizierten Rindern ausschließlich im zentralen Nervensystem (ZNS) ausreichend hoch ist, beschränkt sich die bisherige Diagnostik auf *post-mortem*-Tests und setzt

eine Inkubationszeit des infizierten Organismus von mindestens 18 Monaten bis zu mehreren Jahren voraus.

- 5 Neben dem oben beschriebenen Nachweis von PrP^{Sc} gibt es zwei weitere methodische Verfahren zur Diagnostik von TSEs: die histopathologische Detektion der typischen schwammartigen Veränderungen im ZNS und ein Bioassay, welches die Infektiosität der Proben im Mausmodell nachweist. Beide Methoden haben ebenfalls entscheidende Nachteile. Die Histopathologie ist nicht zur präklinischen Diagnostik geeignet, da die strukturellen Veränderungen im Gehirn erst zu einem späten Zeitpunkt der Inkubation, kurz vor der klinischen Phase auftreten. Zudem
- 10 erfolgt die Diagnose hier *post mortem*, da die Entnahme des notwendigen Hirnmaterials am lebenden Organismus nicht möglich ist. Der Bioassay ist zwar theoretisch in der Lage, eine einzige infektiöse Einheit zu detektieren, dauert jedoch mindestens mehrere Monate oder auch Jahre.
- 15 Um die Diagnostik so schnell wie möglich nach einer eventuellen Infektion bzw. bereits an einem noch lebenden Organismus durchführen zu können, muss die Sensitivität der bisherigen Nachweisverfahren wesentlich erhöht und der Nachweis in anderen Geweben/Körperflüssigkeiten als dem ZNS ermöglicht werden.
- 20 Von Fischer et al. [Fischer, MB; Roeckl, C; Parizek, P; Schwarz, HP; Aguzzi, A (2000): Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. Nature, 408:479-483] wurde eine Bindung des pathologischen PrP^{Sc} an humane Serumproteine wie z.B. Plasminogen beschrieben. Die Bindung des Prion-Proteins an Plasminogen ist abhängig von der Konformation des Proteins, da PrP^C nicht gebunden werden kann. Fibrinogen ist ebenfalls in der Lage, PrP^{Sc} zu binden, jedoch
- 25 nicht in Abwesenheit von Ca²⁺-Ionen.

Nach WO 02/00713 A1 wird die spezifische Bindung von PrP^{Sc} an humanes Plasminogen zur Isolation von PrP^{Sc} aus ZNS-Material verwendet. Dazu wird humanes Plasminogen an magnetischen Partikeln immobilisiert. Dieses Verfahren ist jedoch nur für den Nachweis von

30 PrP^{Sc} in solchen Körperflüssigkeiten und Geweben geeignet, die kein Plasminogen enthalten und ist z.B. für den Nachweis von PrP^{Sc} in Serum ungeeignet. Weitere Nachteile, dieses Verfahrens sind der hohe Preis und die begrenzte Proteinbindungs-Kapazität der darin verwendeten Plasminogen-beladenen magnetischen Partikel.

Daher liegt der Erfindung die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren bereitzustellen, welches eine Diagnose von TSE von noch lebenden Organismen ermöglicht.

Die Aufgabe wird durch den in den Patentansprüchen definierten Gegenstand gelöst.

5

Die nachfolgenden Figuren erläutern die Erfindung.

Fig. 1 zeigt in einer graphischen Darstellung das Prinzip eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Anreicherung und zum Nachweis von PrP^{Sc} unter Verwendung von Festphasen-gekoppelten β -Faltblatt bindenden Molekülen.

10

Fig. 2 zeigt schematisch das Prinzip eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Isolierung des PrP^{Sc}-Plasminogen-Komplexes aus Körperflüssigkeiten mit anschließendem Nachweis des angereicherten PrP^{Sc} mittels Plasminogen-Affinitätschromatographie.

15

Fig. 3 zeigt den Aufbau des PrP^{Sc}-Bindungsassays im MTP-Format (Beispiel 1). Verschiedene BSB-Peptide wurden als potentielle PrP^{Sc}-Fänger an einem Träger immobilisiert, nach Inkubation mit dem Probenmaterial wurde gebundenes PrP^{Sc} mittels monoklonaler anti-PrP-Antikörper visualisiert.

20

Der Begriff „ β -Faltblatt-bindendes Molekül“ wie hier verwendet beschreibt ein organisches Molekül, welches aufgrund seiner dreidimensionalen Struktur und/oder seiner physikalischen Eigenschaften in der Lage ist, in Wechselwirkungen mit β -Faltblatt-Strukturen in Proteinen zu treten und diese aufgrund dessen zu binden. Beispielhafte β -Faltblatt-bindende Moleküle sind in SEQ ID NO: 1 bis 10 aufgeführt.

25

Der Begriff „ β -sheet-breaker (BSB)“ wie hier verwendet beschreibt kurze Peptide, die an β -Faltblatt-Strukturen von β -Amyloid (Proteinaggregate bei der Alzheimerschen Erkrankung) und Amyloid-ähnlichen Strukturen binden und deren abnormale Faltung blockieren bzw. rückgängig machen können.

30

Der Begriff „Plasminogen-Bindungspartner“ wie hier verwendet beschreibt organische Verbindungen, die in der Lage sind, Plasminogen zu binden und mit deren Hilfe Plasminogen aus biologischen Proben isoliert werden kann.

Als „BSE-positive Rinder“ werden hier solche Tiere bezeichnet, in deren Stammhirn-Gewebe *post mortem* Proteinase K-resistentes Prion-Protein nachgewiesen werden kann.

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc}), umfassend die folgenden Schritte:

- a) Inkubieren einer Probe mit einem festen Träger, wobei der feste Träger mit einem β -Faltblatt-bindenden Molekül gekoppelt ist,
- b) Entfernen der nicht an den β -Faltblatt-bindenden Molekülen gebundenen
10 Probenbestandteile, und
- c) Nachweis der an den β -Faltblatt-bindenden Molekülen gebundenen Probenbestandteile (Fig. 1).

Die zu untersuchende Probe kann eine Körperflüssigkeit, z.B. Blut, Serum, Plasma, Liquor,
15 Tränenflüssigkeit, Urin, Speichel, Lymphe, oder ein Zell-Lysat, z.B. aus Leukozyten oder von Zellen der lymphatischen Gewebe, oder ein Gewebehomogenat, z.B. von Geweben des zentralen Nervensystems, von Lymphgewebe (z.B. Milz, Tonsillen, Lymphknoten) oder anderen Organen sein.

20 Vor der Inkubation kann die Probe gegebenenfalls einer Probenvorbereitung unterzogen werden. Dies kann insbesondere für Gewebeproben erforderlich sein. Diese können nach Zugabe einer geeigneten Puffer-Lösung, z.B. 50mM Phosphat-Puffer, pH 7,5, mechanisch zerkleinert, z.B. durch Ultraschall- oder Ribolyser-Behandlungen, und homogenisiert werden, um deren Bestandteile in Lösung bzw. Suspension zu bekommen. Zur Abtrennung fester Bestandteile kann
25 die Probe ferner einem Zentrifugations- und/oder Filtrationsschritt unterzogen werden.

Gegebenenfalls kann die Probe mit oder ohne Probenvorbereitung vor der Inkubation zusätzlich oder ausschließlich einer Proteinase-Behandlung zum proteolytischen Abbau von PrP^C unterzogen werden. Dazu wird das Probenmaterial mit einer Protease, z.B. Proteinase K
30 behandelt. Der Protease-Verdau kann bei Standardbedingungen für die jeweilige Protease oder nach Angaben des Herstellers, vorzugsweise bei 37°C für 1h durchgeführt werden. Die verwendete Enzymkonzentration kann je nach Probenmaterial im Bereich von etwa 10µg/ml und etwa 1mg/ml liegen, vorzugsweise werden etwa 50µg/ml Enzym bei einem Proteingehalt des Probenmaterials von etwa 0,5 bis etwa 10mg/ml verwendet.

Feste Träger können sphärische Polymere (z.B. Sepharose, Agarose oder Latex), Plastik-Oberflächen (z.B. Mikrotiterplatten), Kieselgel-beschichtete Glasplatten (z.B. für Dünnschichtchromatographie), Kapillaren oder Membranen sein. Die sphärischen Polymere können als Träger in einer Säulen-Chromatographie oder im Batch-Verfahren (z.B. Magnetic Beads) verwendet werden. Werden die Polymere zur Säulen-Chromatographie eingesetzt, werden sie vorzugsweise in vorgepackten Einweg-Säulen verwendet. Neben den hier aufgeführten festen Trägern ist ferner jeder feste Träger geeignet, der zur Kopplung von β -Faltblatt-bindenden Molekülen verwendet werden kann.

Die Probe kann in einem geschlossenen Gefäß für etwa 5 bis etwa 120min bei einer Temperatur im Bereich von etwa 4°C bis etwa 50°C mit der festen Träger, z.B. Glasplatten, Mikrotiterplatten, inkubiert werden. Vorzugsweise erfolgt die Inkubation bei 37°C für 1h in einem Schüttelinkubator mit niedriger Rotationsfrequenz (z.B. 80rpm). Durch die Inkubation der Probe mit dem festen Träger wird das in der Probe enthaltene PrP^{Sc} an das an der festen Träger immobilisierte β -Faltblatt-bindende Molekül gebunden. Wird als feste Träger z.B. ein sphärisches Polymer als Träger in einer Säulen-Chromatographie verwendet, findet die Inkubation in der Säule statt. Je nach Säule kann die Inkubationszeit variieren, abhängig vom Anschluss der Säule an eine Apparatur.

Die an den festen Träger gekoppelten β -Faltblatt-bindenden Moleküle sind in der Lage, PrP^{Sc}, nicht jedoch PrP^C zu binden. Erfindungsgemäß sind die β -Faltblatt-bindenden Moleküle Oligopeptide bestehend aus 3 bis etwa 30 Aminosäuren, vorzugsweise 4, 5 oder 6 Aminosäuren. Diese Peptide können C- und/oder N-terminal modifiziert sein, z.B. um eine bessere Löslichkeit zu erreichen. Insbesondere bevorzugte β -Faltblatt-bindende Moleküle sind in Tab. 1 und als SEQ ID NO: 1 bis 10 aufgeführt. Das β -Faltblatt-bindende Molekül kann ebenfalls ein substituierter heterocyclischer Aromat sein, vorteilhaft ein Flavonoid, beispielsweise Thioflavin T, Baicalin oder Quercitrin.

Die Immobilisierung der β -Faltblatt-bindenden Moleküle an den festen Träger erfolgt vorzugsweise über eine kovalente Bindung. Zur Kopplung an den Träger werden funktionelle Gruppen, wie z.B. Amino-, Carboxyl- oder Hydroxyl-Gruppen, am β -Faltblatt-bindenden Molekül genutzt. Ist das β -Faltblatt-bindende Molekül ein Peptid, erfolgt die Kopplung vorzugsweise über die Amino-Gruppe am N-Terminus oder die Carboxyl-Gruppe am C-

Terminus. Ist das Oligopeptid das Pentapeptid mit der Sequenz KLVFF (SEQ ID NO:2), wird vorzugsweise über die Carboxyl-Gruppe am C-Terminus gekoppelt, da bei einer Amino-Gruppenkopplung das Peptid auch an der Seitenkette des Lysin-Restes fixiert werden würde, was zur sterischen Behinderung der PrP^{Sc}-Bindung führen könnte.

Im Anschluss an die Inkubation der Probe mit dem festen Träger erfolgt das Entfernen der nicht am β -Faltblatt-bindenden Molekül gebundenen Probenbestandteile, vorzugsweise durch einen Waschschrift. Als Waschlösung dient eine gepufferte Lösung, mit geeigneten, Stringenz-erhöhenden Zusätzen. Der pH-Wert der Waschlösung liegt im neutralen Bereich, vorzugsweise bei pH7,5. Zum Puffern der Lösung dient vorzugsweise 50mM Phosphatpuffer. Darüber hinaus ist jeder Puffer geeignet, mit dem ein pH-Wert im neutralen Bereich eingestellt werden kann. Die Stringenz-erhöhenden Zusätze können anorganische Salze, z.B. NaCl, sowie Detergenzien, z.B. SDS, Triton X 100 oder Tween 20, oder chaotrope Reagenzien, z.B. Harnstoff, Guanidinium Hydrochlorid oder Guanidinium Isothiocyanat, sein. Vorteilhaft wird eine gepufferte Lösung mit 1 bis 4M NaCl als Waschlösung eingesetzt.

In Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Trägermaterials wird das an die β -Faltblatt-bindenden Moleküle gebundene PrP^{Sc} gegebenenfalls von dem festen Träger eluiert (z.B. bei Einsatz von sphärischen Polymeren in der Säulen-Chromatographie). Bei anderen Trägern, z.B. Membranen oder Plastikoberflächen, kann der Nachweis des PrP^{Sc} direkt an dem festen Träger erfolgen. Falls gewünscht, kann jedoch auch hier eluiert werden.

Zur Elution des PrP^{Sc} vom β -Faltblatt-bindenden Molekül und damit von dem festen Träger wird der Träger mit einem möglichst kleinen Volumen Elutionslösung gespült. Um einen für die Sensitivität des verwendeten Nachweissystems ausreichenden Konzentrationseffekt zu erzielen, ist das Elutionsvolumen um ein Vielfaches kleiner, als das Probenvolumen. Vorteilhaft ist das Elutionsvolumen um den Faktor 100 bis 10000 kleiner als das verwendete Probenvolumen.

Beim Vergleich der Elutionseffizienzen (Tab. 2) erwies sich insbesondere ein Detergenz-haltiger Puffer (mit 5% SDS) als geeignet, PrP^{Sc} vollständig vom Fänger-Molekül zu eluieren. In Anwesenheit von chaotropen Reagenzien (z.B. 6M Harnstoff) wurde PrP^{Sc} nur teilweise eluiert. In Elutionspuffern mit niedrigem pH-Wert (z.B. pH3) bzw. hoher Ionenstärke (z.B. 2M NaCl) blieb PrP^{Sc} nahezu vollständig am Fänger-Molekül gebunden.

Als Elutionslösung wird eine gepufferte Lösung verwendet, Zusätze enthaltend, welche die Bindung zwischen PrP^{Sc} und dem Fänger-Molekül lösen. Der pH-Wert der Elutionslösung liegt im Bereich von etwa pH 6 bis etwa pH 8,5; vorzugsweise bei pH 7,5. Zum Puffern der Lösung dient vorzugsweise 50mM Phosphatpuffer. Darüber hinaus ist jeder Puffer geeignet, mit dem ein

5 pH-Wert im vorstehend beschriebenen, vorzugsweise im neutralen Bereich, eingestellt werden kann. Die Zusätze können beispielsweise Detergenzien, z.B. SDS, Triton X 100 oder Tween 20, chaotrope Reagenzien, z.B. Harnstoff, Guanidinium Hydrochlorid oder Guanidinium Isothiocyanat, anorganische Salze, z.B. NaCl, oder organische Verbindungen, z.B. ϵ -Aminocapronsäure oder Lysin, sein. Vorzugsweise enthält die Elutionslösung Detergenzien,

10 beispielsweise 5% SDS.

Anschließend wird das in den vorhergehenden Verfahrensschritten angereicherte PrP^{Sc} nachgewiesen. Dazu können immunchemische (z.B. ELISA, Western Blot, Immunpräzipitation), biophysikalische (z.B. Massenspektrometrie, Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie),

15 biochemische (z.B. Bestimmung biochemischer Parameter, wie z.B. relative Molmasse, N-terminale bzw. C-terminale Aminosäuresequenz, Assoziations- und Dissoziationskonstanten von Bindungspartnern) oder biologische (z.B. Cytotoxizitätsassay) Nachweisverfahren zum Einsatz kommen.

20 Vorzugsweise wird der Nachweis mit einem Verfahren durchgeführt, das eine schnelle Detektion der PrP^{Sc} ermöglicht. Das kann z.B. ein immunologisches Nachweisverfahren vorzugsweise ein Sandwich-ELISA sein. Der Sandwich-ELISA wird nach bekanntem Verfahren durchgeführt. Dabei kann die Markierung des Detektions-Antikörpers z.B. ein Enzym (z.B. Meerrettich-Peroxidase), eine gefärbte Verbindung, ein Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Fluorescein), ein

25 Goldpartikel oder eine Nukleinsäure (z.B. ein DNA- oder RNA-Oligonucleotid) sein.

Bei einer Enzym-Markierung wird die Farbintensität nach Substratumsetzung photometrisch erfasst und ist der in der Probe enthaltenen PrP^{Sc} -Menge proportional. Ist die Antikörpermarkierung eine gefärbte Verbindung oder ein Fluoreszenzfarbstoff, wird die Farb-

30 bzw. Fluoreszenzintensität direkt gemessen. Ist die Antikörpermarkierung ein Nukleinsäure, wird die Menge an gebundenem Antikörper über die Absorption des DNA- bzw. RNA-Labels bestimmt, wobei das Signal durch PCR (z.B. real-time-PCR) amplifiziert wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zum Nachweis von pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc}), umfassend die folgenden Schritte:

- a) Zugabe von Chelatbildner zu einer zu untersuchenden Probe,
- b) Inkubieren der Probe nach Schritt a) mit einem festen Träger, wobei der festen Träger mit einem Plasminogen-Bindungspartner gekoppelt ist,
- c) Entfernen der nicht an den Plasminogen-Bindungspartner gebundenen Probenbestandteile,
- d) Elution der gebundenen Probenbestandteile,
- e) Protease-Behandlung des Eluats und
- f) Nachweis von PrP^{Sc} im Eluat (Fig. 2).

Da dieses Verfahren die Bindung von PrP^{Sc} an endogenes Plasminogen nutzt, kann die zu untersuchende Probe jede Körperflüssigkeit bzw. jedes Gewebe sein, welches natürlicherweise Plasminogen enthält, z.B. Blut, Plasma.

Der Probe wird ein Chelatbildner z.B. EDTA zugesetzt, um eine Bindung des PrP^{Sc} an Fibrinogen zu verhindern. Ist die zu untersuchende Probe z.B. Voll-Blut, können die darin enthaltenen Zellen in bekannter Weise lysiert werden (z.B. Ultraschall-Behandlung). Zur Abtrennung fester Bestandteile kann die Probe einem Zentrifugations- und/oder Filtrationsschritt unterzogen werden. Zur Ausbildung des PrP^{Sc} -Plasminogen-Komplexes kann die Probe ferner für 5 bis 120min bei einer geeigneten Temperatur, vorzugsweise 37°C , inkubiert werden.

Feste Träger können sphärische Polymere (z.B. Sepharose, Agarose oder Latex), Plastik-Oberflächen (z.B. Mikrotiterplatten), Kieselgel-beschichtete Glasplatten (z.B. für Dünnschichtchromatographie), Kapillaren oder Membranen sein. Die sphärischen Polymere können als Träger in einer Säulen-Chromatographie oder im Batch-Verfahren (z.B. Magnetic Beads) verwendet werden. Werden die Polymere zur Säulen-Chromatographie eingesetzt, werden sie vorzugsweise in vorgepackten Einweg-Säulen verwendet. Neben den hier aufgeführten festen Trägern ist ferner jeder feste Träger geeignet, der zur Kopplung von Plasminogen-Bindungspartnern verwendet werden kann.

Die kovalent an den festen Träger gekoppelten Plasminogen-Bindungspartner sind in der Lage, sowohl Plasminogen, als auch den PrP^{Sc} -Plasminogen-Komplex zu binden. Vorzugsweise ist der Plasminogen-Bindungspartner ein anionisches Polymer oder Protein, insbesondere Heparin,

Casein oder eine ähnliche Substanz. Solche Trägermaterialien, wie z.B. Casein-Agarose oder Heparin-Sepharose, werden nach bekannten Verfahren hergestellt und sind kommerziell erhältlich.

- 5 Die Probe kann in einem geschlossenen Gefäß für etwa 5 bis etwa 120min bei einer Temperatur im Bereich von etwa 4°C bis etwa 50°C mit dem festen Träger, z.B. Glasplatten, Mikrotiterplatten, inkubiert werden. Vorzugsweise erfolgt die Inkubation bei 37°C für 1h in einem Schüttelinkubator mit niedriger Rotationsfrequenz (z.B. 80rpm). Durch die Inkubation der Probe mit dem festen Träger wird der in der Probe enthaltene PrP^{Sc}-Plasminogen-Komplex an
- 10 den an den festen Träger immobilisierten Plasminogen-Bindungspartner gebunden. Wird als feste Träger z.B. ein sphärisches Polymer als Träger in einer Säulen-Chromatographie verwendet, findet die Inkubation in der Säule statt. Je nach Säule kann die Inkubationszeit variieren, abhängig vom Anschluss der Säule an eine Apparatur.
- 15 Im Anschluss an die Inkubation erfolgt das Entfernen der nicht am Plasminogen-Bindungspartner gebundenen Probenbestandteile, vorzugsweise durch einen Waschschrift. Als Waschlösung dient eine gepufferte Lösung, welche Stringenz-erhöhende Zusätze enthalten kann. Der pH-Wert der Waschlösung liegt im leicht sauren Bereich, vorzugsweise zwischen pH4,5 und 5,5. Zum Puffern der Lösung dient vorzugsweise 10mM Citrat-Phosphat-Puffer. Darüber hinaus
- 20 ist jeder Puffer geeignet, mit dem ein pH-Wert im leicht sauren Bereich eingestellt werden kann. Die Stringenz-erhöhenden Zusätze können anorganische Salze, z.B. NaCl, sowie Detergenzien, z.B. SDS, Triton X 100 oder Tween 20, oder chaotrope Reagenzien, z.B. Harnstoff, Guanidinium Hydrochlorid oder Guanidinium Isothiocyanat, sein.
- 25 In Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Trägermaterials wird PrP^{Sc} gegebenenfalls von dem festen Träger eluiert (z.B. bei Einsatz von sphärischen Polymeren in der Säulen-Chromatographie). Bei anderen Trägern, z.B. Membranen oder Plastikoberflächen, kann der Nachweis des PrP^{Sc} direkt an dem festen Träger erfolgen.
- 30 Zur Elution des PrP^{Sc} bzw. PrP^{Sc}-Plasminogen-Komplexes vom Plasminogen-Bindungspartner und damit von dem festen Träger wird der Träger mit einem möglichst kleinen Volumen Elutionslösung gespült. Um einen die Sensitivität des angeschlossenen Nachweissystems ausreichenden Konzentrationseffekt zu erreichen, ist das Elutionsvolumen um ein Vielfaches

kleiner, als das Probenvolumen. Vorteilhaft ist das Elutionsvolumen um den Faktor 100 bis 10000 kleiner als das verwendete Probenvolumen.

Als Elutionslösung wird eine gepufferte Lösung verwendet, die Zusätze enthält, welche die Bindung zwischen Plasminogen und dem Plasminogen-Bindungspartner bzw. zwischen PrP^{Sc} und Plasminogen lösen. Der pH-Wert der Elutionslösung liegt im leicht sauren Bereich, vorzugsweise bei pH 4,5 bis 5,5. Zum Puffern der Lösung dient vorzugsweise 10mM Citrat-Phosphat-Puffer. Darüber hinaus ist jeder Puffer geeignet, mit dem ein pH-Wert im leicht sauren Bereich eingestellt werden kann. Die Zusätze können beispielsweise anorganische Salze, z.B. NaCl, Detergenzien, z.B. SDS, Triton X 100 oder Tween 20, chaotrope Reagenzien, z.B. Harnstoff, Guanidinium Hydrochlorid oder Guanidinium Isothiocyanat, oder organische Verbindungen, z.B. ϵ -Aminocapronsäure oder Lysin, sein. Vorzugsweise enthält die Elutionslösung anorganische Salze, beispielsweise 0,5M NaCl, um die Bindung zwischen Plasminogen und dem Plasminogen-Bindungspartner zu lösen. Die Elutionslösung enthält vorzugsweise ϵ -Aminocapronsäure, wenn die Bindung zwischen PrP^{Sc} und Plasminogen gelöst werden soll.

Das in der eluierten Proteinfraction gegebenenfalls enthaltene PrP^{C} kann nach bekannten Verfahren mit Proteinase K hydrolysiert werden.

Anschließend wird das in den vorhergehenden Verfahrensschritten angereicherte PrP^{Sc} nachgewiesen. Dazu können die bereits vorstehend erwähnten Nachweisverfahren entsprechend verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Kit zum Nachweis von pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc}) in Körperflüssigkeiten, Zell-Lysaten, Gewebehomogenaten oder anderen Flüssigkeiten. Erfindungsgemäß enthält der Test-Kit einen festen Träger zur Anreicherung von PrP^{Sc} , ein immunologisches Nachweissystem, Solubilisierungs-, Wasch- und Elutionspufferkonzentrationen, verschiedenen Kontrollen, einem Enzym-markierten anti- PrP -Antikörper sowie einer entsprechenden Substrat- und Stopplösung.

Die verwendeten festen Träger sind vorzugsweise affinitätschromatographische Materialien, z.B. Sepharose oder Agarose, die in Einwegsäulen verwendet werden und, die mit den erfindungsgemäßen β -Faltblatt-bindenden Molekülen oder mit den erfindungsgemäßen

Plasminogen-Bindungspartnern gekoppelt sind. Die festen Träger mit den erfindungsgemäßen Kopplungen können als Suspension, in getrockneter Form oder bereits in Einweg-Säulen gepackt im Test-Kit enthalten sein.

- 5 Das immunologische Nachweissystem ist vorzugsweise ein Sandwich-ELISA, bei dem ein zweiter fester Träger z.B. eine Mikrotiterplatte mit einem spezifischen Antikörper gegen PrP, vorzugsweise mit monoklonalen anti-PrP-Antikörper, insbesondere Maus-anti-PrP-Antikörper, beschichtet ist. Die festen Träger liegen dem Test-Kit insbesondere vakuumverpackt bei.
- 10 Als Kontrollen werden vorzugsweise rekombinant hergestelltes PrP bzw. PrP-Peptide verwendet. Als Antikörper-Markierung wird vorzugsweise Meerrettich-Peroxidase verwendet.

- Die erfindungsgemäßen Verfahren und Test-Kits ermöglichen breit angelegte Untersuchungen mit hohen Probenzahlen, wie sie in den Bereichen Medizin und Landwirtschaft gefordert werden. Im Unterschied zu allen bisher beschriebenen Verfahren sind die erfindungsgemäßen Verfahren auch für die TSE-Diagnostik am lebenden Tieren und Menschen geeignet.
- 15

Anhand der nachfolgenden Beispiele wird die Erfindung näher erläutert.

20 Beispiel 1: Isolierung von PrP^{Sc} mittels BSB-Peptiden im MTP-Format

- Eine MTP (Mikrotiterplatte) (Nunc-ImmunoTM Plate MaxisorpTM Surface, F96 (Nunc, Roskilde, Dänemark)), wurde mit verschiedenen BSB-Peptiden beschichtet (Fig. 3). Die Beschichtung erfolgte durch Inkubation mit 100µl Peptidlösung (10µg/ml in 0,1M Carbonatpuffer pH9,6) pro Kavität für 16h bei 4°C. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die MTP dreimal mit 300µl Waschpuffer (Platelia[®] BSE Detection Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) pro Kavität gewaschen. Freie Bindungsplätze wurden durch Inkubation mit 0,5% Casein in Waschpuffer bei Raumtemperatur für 1h blockiert. Nach einem Waschschriff (dreimal 300µl Waschpuffer pro Kavität) wurde die beschichtete MTP mit 100µl pro Kavität der PrP^{Sc}-haltigen Probe (Hirnhomogenat von BSE-positiven Rindern) für 1h bei 37°C mit Folie abgedeckt inkubiert. Nicht gebundenes Probenmaterial wurde abgesaugt und die MTP dreimal mit 300µl Waschpuffer pro Kavität gewaschen. Die Inkubation mit dem Detektions-Antikörper (Platelia[®] BSE Detection Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) erfolgte für 1h bei Raumtemperatur. Überschüssiges Konjugat wurde durch fünfmaliges Waschen mit 300µl Waschpuffer pro Kavität
- 25
- 30

entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung (Platelia® BSE Detection Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) wurde die Farbentwicklung nach 30min durch Zusatz von 1M HCl abgestoppt und die Farbintensität durch Extinktions-Messung bei 450nm (Referenz 620nm) registriert.

- 5 Die gemessene Extinktion ist der am BSB-Peptid gebundenen Menge an PrP^{Sc} proportional und somit ein Maß für die Effizienz des Fänger-Moleküls. Die relativen Bindungseffizienzen der getesteten BSB-Peptide sind in Tab. 1 zusammengefasst, wobei das Signal des besten β -Faltblatt-bindenden Moleküls (Peptid 2) gleich 100% gesetzt wurde.

10 **Tab. 1: Vergleich der PrP^{Sc}-Bindungseffizienz verschiedener BSB-Peptide**

Nr.	Sequenz	Effizienz	
Peptid 1	Arg-Val-Val-Ile-Ala	54,7	SEQ ID NO: 1
Peptid 2	Lys-Leu-Val-Phe-Phe	100,0	SEQ ID NO: 2
Peptid 3	Leu-Pro-Phe-Phe-Asp	46,6	SEQ ID NO: 3
Peptid 4	Propionyl-Ile-Ile-Gly-Leu	55,1	SEQ ID NO: 4
Peptid 5	Propionyl-Arg-Ile-Ile-Gly-Leu	58,1	SEQ ID NO: 5
Peptid 6	Gly-Val-Val-Ile-Ala	64,5	SEQ ID NO: 6
Peptid 7	Propionyl-DArg-DArg-DAla-DPhe-DPhe-DVal-amid	76,5	SEQ ID NO: 7

Beispiel 2: Elution des an KLVFF gebundenen PrP^{Sc} im MTP-Format

- 15 Die Bindung zwischen PrP^{Sc} und den Fänger-Molekülen ist sehr stark, so dass zur Elution des PrP^{Sc} von dem festen Träger vergleichsweise drastische Bedingungen nötig sind. Die Elutionsbedingungen wurden ebenfalls im MTP-Format getestet.

Analog Beispiel 1 wurde eine MTP mit Peptid 2 (KLVFF) beschichtet und mit PrP^{Sc} beladen.

- 20 Nach dreimaligem Waschen mit 300 μ l Waschpuffer (Platelia® BSE Detection Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) pro Kavität wurden jeweils 100 μ l der potentiellen Elutionspuffer zugegeben und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgenommen und die eluierte Menge PrP^{Sc} im Elutionspuffer sowie die verbleibende Menge PrP^{Sc} an der MTP mit Hilfe des Platelia® BSE Detection Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) bestimmt. Beim Vergleich der Elutionseffizienzen (Tab. 2) erwies sich lediglich ein Detergenz-haltiger Puffer (mit 5% SDS) als geeignet, PrP^{Sc} vollständig vom Fänger-Molekül zu eluieren. In Anwesenheit von chaotropen Reagenzien (z.B. 6M Harnstoff) wurde PrP^{Sc} nur
- 25

teilweise eluiert. In Elutionspuffern mit niedrigem pH-Wert (z.B. pH3) bzw. hoher Ionenstärke (z.B. 2M NaCl) blieb PrP^{Sc} nahezu vollständig am Fänger-Molekül gebunden.

Tab. 2: Vergleich verschiedener Elutionsbedingungen

	Eluent	Elutionseffizienz
A	2M NaCl	+/-
B	pH 3	+/-
C	6M Harnstoff	+
D	5% SDS	+++

Beispiel 3: Kovalente Kopplung des BSB-Peptids KLVFF an EAH-Sepharose

Bei einer Kopplung über Amino-Gruppen würde das Peptid sowohl am N-Terminus als auch an der Seitenkette (Lys) fixiert werden, was zur Störung der dreidimensionalen Struktur führen könnte. Aus diesem Grund erfolgte die spezifische Bindung des β -Faltblatt-bindendes Moleküls KLVFF an den festen Träger über die Carboxyl-Gruppe am C-Terminus des Peptids. Als Trägermaterial diente EAH-Sepharose[®] 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

Zur Vorbereitung der Kopplungsreaktion wurde die EAH-Sepharose mit 0,5M NaCl gewaschen und überstehende Flüssigkeit vollständig entfernt. Der Ligand, das Pentapeptid mit der Sequenz KLVFF, wurde in H₂O gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 4,5 eingestellt. Das Gel wurde in der Ligand-Lösung resuspendiert und EDC (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) wurde in einer Endkonzentration von 0,1M zugegeben. Die Kopplungsreaktion erfolgte bei Raumtemperatur über 24h unter leichtem Schwenken. Anschließend wurde der Überstand des abgesetzten Gels vollständig abgenommen. Gegebenenfalls vorhandene freie Bindungsplätze wurden mit 1M Essigsäure in Anwesenheit von 0,1M EDC blockiert. Das KLVFF-beladene Gel wurde in eine Chromatographiesäule gefüllt und mindestens dreimal abwechselnd mit Puffer A (0,1M Na-Acetat, 0,5M NaCl pH4) und Puffer B (0,1M Tris/HCl, 0,5M NaCl pH8) und anschließend mit H₂O gewaschen.

Beispiel 4: Isolierung von PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat mittels KLVFF-Sepharose

Zum Nachweis der Eignung der KLVFF-Sepharose als β -Faltblatt-bindendes Molekül wurde PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat von BSE-positiven Rindern an das Säulenmaterial gebunden und anschließend wieder eluiert. Die Aufarbeitung des Hirnmateri- als 5
als BSE Purification Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nach Angaben des Herstellers. Das Probenmaterial wurde in Probenverdünnungspuffer R6 (Platelia[®] BSE Detection Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) aufgenommen. Eine Tropfsäule wurde mit 1ml KLVFF-Sepharose hergestellt wie in Beispiel 3 angegeben gefüllt und mit PBS bei Raumtemperatur äquilibriert. 10
Nach Probenauftragung wurde die Säule mit PBS gewaschen und der Durchlauf fraktioniert gesammelt. Gebundenes PrP^{Sc} wurde anschließend mit 5% SDS in PBS eluiert. Die in den einzelnen Fraktionen enthaltene Menge an PrP^{Sc} wurde immunologisch mit Hilfe des Platelia[®] BSE Detection Kit ermittelt.

Beispiel 5: Isolierung von Plasminogen-PrP^{Sc}-Komplexen aus Rinderplasma-Proben mittels Heparin-Sepharose HP

Der EDTA-Plasma-Probe eines gesunden Rindes wurde PrP^{Sc}-haltiges Probenmaterial aus der Obexregion von BSE-positiven Rindern zugesetzt. Das Hirnhomogenat wurde dazu analog 20
Beispiel 4 mit dem BSE Purification Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) aufgearbeitet. Um die Ausbildung des Plasminogen-PrP^{Sc}-Komplexes zu ermöglichen, wurde die Probe für 2h bei 37°C inkubiert. Eine 1ml-Heparin-Sepharose-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) wurde mit 15mM Citrat-Phosphat-Puffer pH5,3 äquilibriert. Nach Probenauftragung 25
wurde mit 10 Säulenvolumen 15mM Citrat-Phosphat-Puffer pH5,3 gewaschen. Die Elution des Plasminogen-PrP^{Sc}-Komplexes erfolgte mit 6 Säulenvolumen 0,5M NaCl in 15mM Citrat-Phosphat-Puffer pH5,3. Die Fraktionen wurden in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. PrP^{Sc} und Plasminogen wurden mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern im Western Blot nach bekannter Weise visualisiert.

Beispiel 6: Isolierung von Plasminogen-PrP^{Sc}-Komplexen aus Rinderplasma-Proben mittels Casein-Agarose

Der EDTA-Plasma-Probe eines gesunden Rindes wurde PrP^{Sc}-haltiges Probenmaterial aus der Obexregion von BSE-positiven Rindern zugesetzt. Das Hirnhomogenat wurde dazu analog Beispiel 4 mit dem BSE Purification Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) aufgearbeitet. Um die Ausbildung des Plasminogen-PrP^{Sc}-Komplexes zu ermöglichen, wurde die Probe für 2h bei 37°C inkubiert. Eine mit 1ml Casein-Agarose gefüllte Tropfsäule (Sigma, Taufkirchen) wurde mit 10mM Tris/HCl-Puffer pH5,0 äquilibriert. Nach Probenauftragung wurde mit 10 Säulenvolumen 10mM Tris/HCl-Puffer pH5,0 gewaschen. Die Elution des Plasminogen-PrP^{Sc}-Komplexes erfolgte mit 6 Säulenvolumen 0,5M NaCl in 10mM Tris/HCl-Puffer pH5,0. Der Nachweis von PrP^{Sc} und Plasminogen in den einzelnen Fraktionen erfolgte wie in Beispiel 5 beschrieben.

Beispiel 7: Herstellung eines festen Trägers zum Einsatz in einem Test-Kit zum Nachweis von angereichertem PrP^{Sc}

Die Beschichtung einer MTP (Nunc-ImmunoTM Plate MaxisorpTM Surface, F96 (Nunc, Roskilde, Dänemark)) erfolgte durch Inkubation von 100µl/Kavität mit einem monoklonalen Maus-anti-PrP-Antikörper (Clone: F89/160.1.5, Dianova, Hamburg) über 12h bei 4-8°C. Nicht gebundener Maus-Anti-PrP-Antikörper wurde abgesaugt und die Platte 3x mit 300µl pro Kavität mit Waschpuffer (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20) gewaschen. Es folgte die Blockierung der freien Bindungsstellen mit 300µl einer 1%-igen Serumalbuminlösung in Carbonatpuffer (0,1M, pH 9,6) 0,5-1h bei Raumtemperatur. Daran schloss sich ein Waschschrift von 3x 300µl Waschpuffer pro Kavität an, bevor die beschichteten und blockierten MTP 12 bis 14h im Luftstrom getrocknet wurden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc}), umfassend die Schritte,
 - a) Inkubieren einer Probe mit einem festen Träger, wobei der feste Träger mit einem β -Faltblatt-bindenden Molekül gekoppelt ist,
 - b) Entfernen der nicht an den β -Faltblatt-bindenden Molekülen gebundenen Probenbestandteile, und
 - c) Nachweis der an den β -Faltblatt-bindenden Molekülen gebundenen Probenbestandteile.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Probe vor Schritt a) einer Proteinase-Behandlung unterzogen wird.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der feste Träger ein sphärisches Polymer, eine Plastik-Oberfläche, Kieselgel-beschichtete Glasplatte, Kapillare oder Membran ist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die β -Faltblatt-bindenden Moleküle Oligopeptide mit einer Länge von drei bis 30 Aminosäureresten oder substituierte heterocyclische Aromaten sind.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Oligopeptide eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 bis 10 aufweisen.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Nachweis mittels eines immunologischen Nachweisverfahrens durchgeführt wird.
7. Verfahren zum Nachweis von pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc}), umfassend die Schritte,
 - a) Zugabe von Chelatbildnern zu einer zu untersuchenden Probe,
 - b) Inkubieren der Probe nach Schritt a) mit einem festen Träger, wobei der feste Träger mit einem Plasminogen-Bindungspartner gekoppelt ist,

- c) Entfernen der nicht an den Plasminogen-Bindungspartner gebundenen Probenbestandteile,
- d) Elution der gebundenen Probenbestandteile,
- e) Protease-Behandlung des Eluats und
- f) Nachweis von PrPSc im Eluat.

5

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der feste Träger ein sphärisches Polymer, eine Plastik-Oberfläche, Kieselgel-beschichtete Glasplatte, Kapillare oder Membran ist.

10

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 oder 8, wobei der Plasminogen-Bindungspartner ein anionisches Polymer oder Protein ist.

15

10. Kit zum Nachweis von pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrPSc), umfassend einen ersten festen Träger gekoppelt mit β -Faltblatt-bindenden Molekülen oder Plasminogen-Bindungspartnern, Wasch- und Elutionslösungen und einem Nachweissystem.

20

11. Kit nach Anspruch 10, wobei das Nachweissystem ein immunologisches Nachweissystem ist und einem zweiten festen Träger, beschichtet mit einem anti-PrP-Antikörper, einem Enzym-markierten Zweit-Antikörper und Substrat- und Stopplösungen umfasst.

25

12. Kit nach Anspruch 10 oder 11, wobei der erste feste Träger in einer Einwegsäule gepackt ist und der zweite feste Träger eine Mikrotiterplatte ist.

FIG. 1

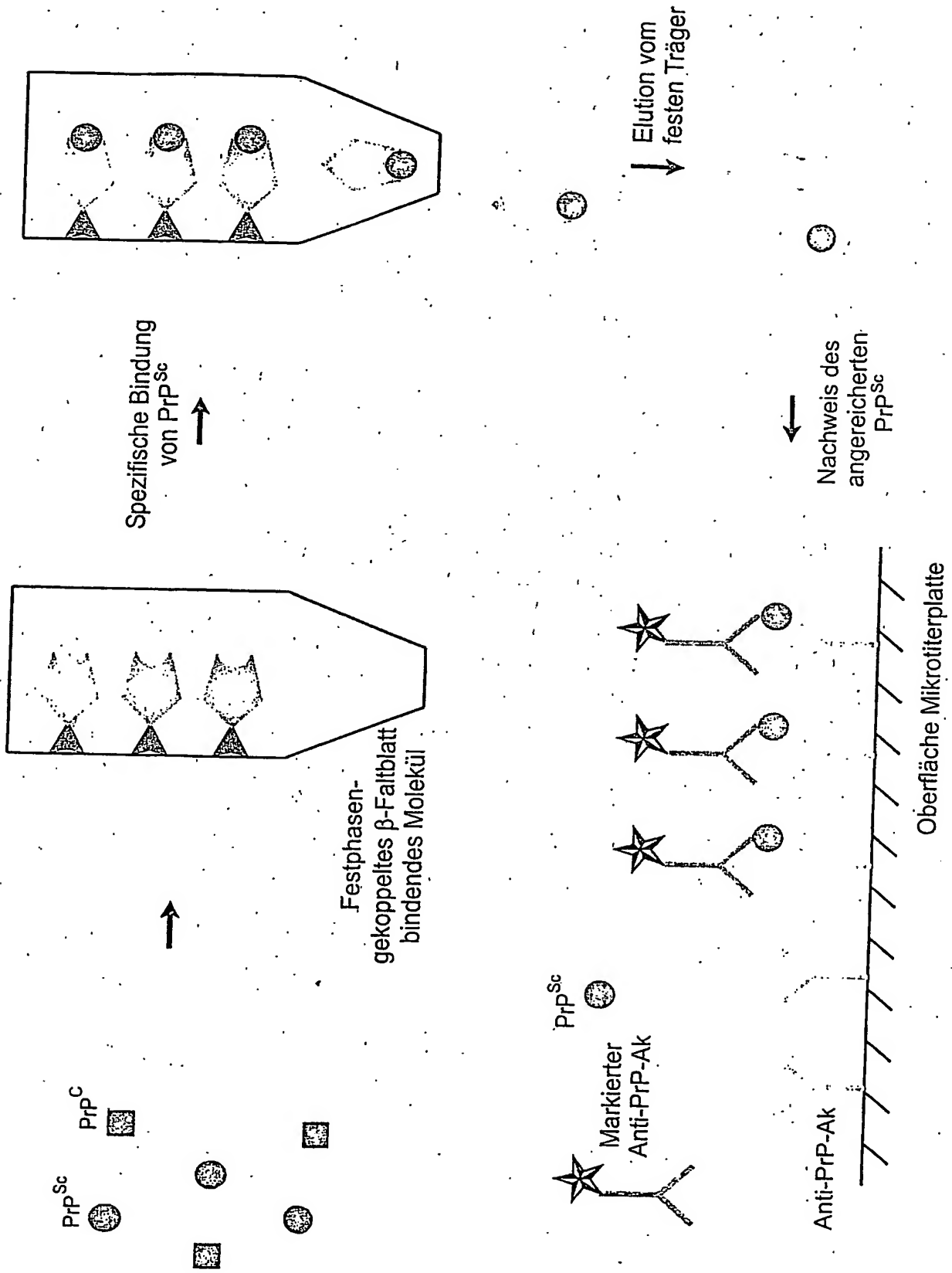


FIG. 2

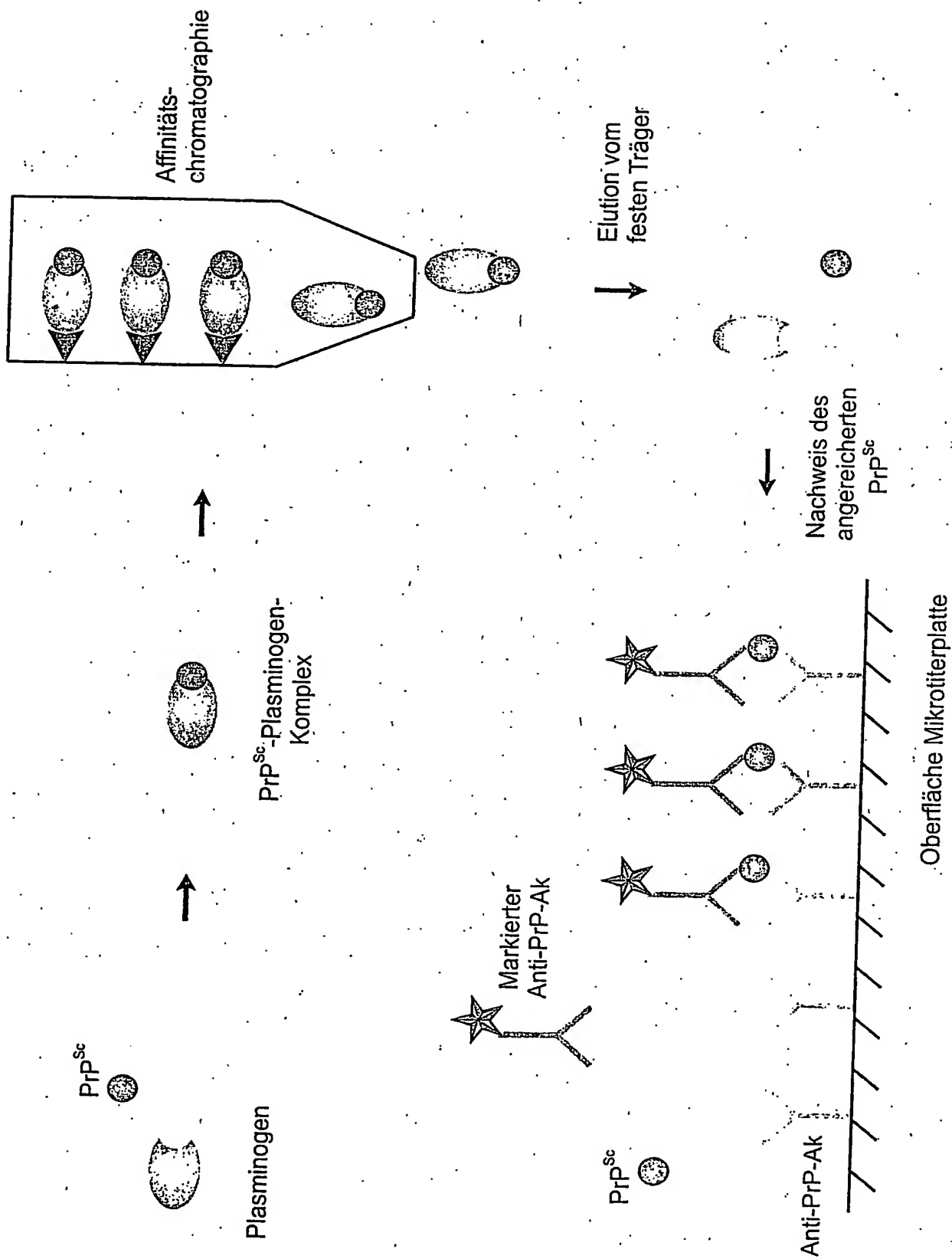
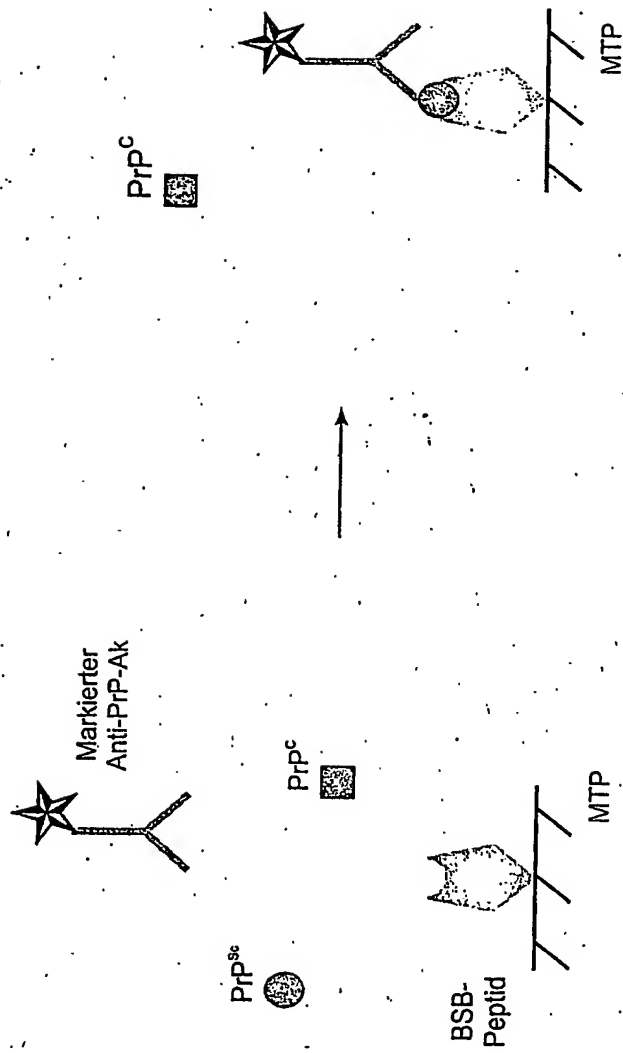


FIG. 3



05.07.02 21

SEQUENCE LISTING

<110> Labor Diagnostik GmbH Leipzig
5 Schleussner, Cathrin

<120> Verfahren zur Anreicherung und zum Nachweis von veränderten
Prion-Proteinen (PrPSc)

10 <130> LAB-001

<140> xx
<141> 2002-07-04

15 <160> 10

<170> PatentIn version 3.1

20 <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> synthetische Sequenz

25 <400> 1

Arg Val Val Ile Ala
1 5

0

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> synthetische Sequenz

<400> 2

Lys Leu Val Phe Phe

1

5

5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

10 <213> synthetische Sequenz

<400> 3

Leu Pro Phe Phe Asp

15

1

5

<210> 4

<211> 4

20 <212> PRT

<213> synthetische Sequenz

<220>

<221> LIPID

25 <222> (1) .. (1)

<223> propionyl

<400> 4

0 Ile Ile Gly Leu

1

<210> 5

<211> 5

01.07.02 26

<212> PRT

<213> synthetische Sequenz

<220>

5 <221> LIPID

<222> (1)..(1)

<223> propionyl

<400> 5

10

Arg Ile Ile Gly Leu

1

5

15 <210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> synthetische Sequenz

20 <400> 6

Gly Val Val Ile Ala

1

5

25

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> synthetische Sequenz

0

<220>

<221> LIPID

<222> (1)..(1)

<223> propionyl

5

0007002

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> AMIDATION

5

<400> 7

Arg Arg Ala Phe Phe Val

1

5

10

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

15 <213> synthetische Sequenz

<400> 8

Ile Ile Gly Leu

20

1

<210> 9

<211> 5

25 <212> PRT

<213> synthetische Sequenz

<400> 9

30 Arg Ile Ile Gly Leu

1

5

<210> 10

5 <211> 6

<212> PRT

<213> synthetische Sequenz

<400> 10

5

Arg Arg Ala Phe Phe Val

1

5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.